

Attorney Docket No. 1628.1015

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:

Jang-Ryol LIU et al.

Application No.: Unassigned

Group Art Unit: Unassigned

Filed: June 28, 2004

Examiner: Unassigned

For: METHOD FOR RECOMBINATING PLASTID USING PROCARYOTIC RECOMBINASE
GENE**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIOR FOREIGN
APPLICATION IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF 37 C.F.R. § 1.55**Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

In accordance with the provisions of 37 C.F.R. § 1.55, the applicant(s) submit(s)
herewith a certified copy of the following foreign application:

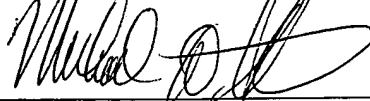
Korean Patent Application No(s). 2002-218

Filed: January 3, 2002

It is respectfully requested that the applicant(s) be given the benefit of the foreign filing
date(s) as evidenced by the certified papers attached hereto, in accordance with the
requirements of 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

STAAS & HALSEY LLP



Date: July 2, 2004

By:

Michael D. Stein
Registration No. 37,2401201 New York Ave, N.W., Suite 700
Washington, D.C. 20005
Telephone: (202) 434-1500
Facsimile: (202) 434-1501



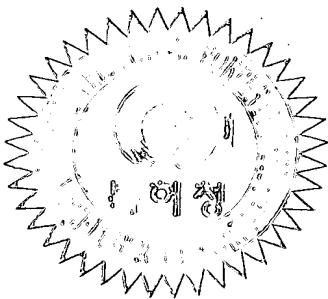
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0000218
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 01월 03일
Date of Application JAN 03, 2002

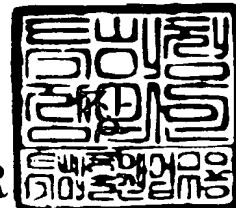
출원인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology



2004 년 06 월 21 일

특 허 청

COMMISSIONER



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.01.03
【발명의 명칭】	미생물 리컴비네이즈를 이용한 색소체 형질전환 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Recombinating Plastid Using Procaryotic Recombinase Gene
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	김원준
【대리인코드】	9-1998-000674-0
【포괄위임등록번호】	1999-059594-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유장렬
【성명의 영문표기】	LIU, JANG RYOL
【주민등록번호】	520103-1005316
【우편번호】	305-350
【주소】	대전광역시 유성구 가정동 과기대 교수아파트 11-201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정원중
【성명의 영문표기】	JEONG, WON JOONG
【주민등록번호】	650306-1058331
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125-705
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	민성란
【성명의 영문표기】	MIN, SUNG RAN
【주민등록번호】	640502-2457221

【우편번호】 305-755
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 132-403
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 정석원
【성명의 영문표기】 JEONG, SEOK WON
【주민등록번호】 750920-1411312
【우편번호】 305-345
【주소】 대전광역시 유성구 신성동 146-13 304호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 한수경
【성명의 영문표기】 HAN, SU KYOUNG
【주민등록번호】 770212-2226128
【우편번호】 301-780
【주소】 대전광역시 중구 태평2동 버드내아파트 111-2002
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【조기공개】 신청
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 6
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 김원준 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 3 면 3,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 6 항 301,000 원
【합계】 333,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 166,500 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 미생물의 리컴비네이즈(recombinase A, recA)가 색소체(Plastid)에서 발현되도록 만든 식물체를 이용하여 homologous recombination 효율과 색소체 형질전환 효율을 높이는 방법에 관한 것이다. 구체적으로는 미생물의 리컴비네이즈 유전자에 색소체 표적서열(plastid targeting sequence)을 포함하는 벡터로 식물체의 핵을 형질전환하여 형질전환 식물체를 제작하고 이 식물체의 색소체에 목적 유전자(target gene)를 포함하는 벡터를 도입하였을 때 homologous recombination 효율이 훨씬 증가하여 기존의 미생물 리컴비네이즈를 가지지 않은 식물체를 사용했을 때보다 선발횟수가 $1/2 \sim 1/3$ 로 감소되며, 2배이상의 형질전환 성공률을 보이는 새로운 색소체 형질전환식물체를 제작하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 3

【명세서】**【발명의 명칭】**

미생물 리컴비네이즈를 이용한 색소체 형질전환 방법 {Method for Recombinating Plastid Using Procaryotic Recombinase Gene}

【도면의 간단한 설명】

- 도 1 은 본 발명의 식물 핵형질전환용 벡터 제작과정의 흐름도.
도 2 는 핵형질전환 식물의 노던블랏(northern blot) 결과 사진.
도 3 은 본 발명의 색소체 형질전환용 벡터 제작고정의 흐름도.
도 4 는 본 발명에 의한 형질전환 방법의 효율을 보여주는 사진.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<5> 본 발명은 미생물의 리컴비네이즈를 이용하여 색소체 형질전환효율을 높이는 방법에 관한 것이다.

<6> 보다 상세하게는 미생물(원핵생물)의 리컴비네이즈 유전자와 색소체 표적서열을 포함하는 벡터로 식물체의 핵을 형질전환하여 색소체에서 리컴비네이즈가 과량 존재하게 되는 식물체를 제작

하고, 목적 유전자 서열 및 선발 마커 유전자 서열을 포함하는 색소체 형질전환용 벡터로 상기 형질전환 식물체를 재차 형질전환시키는 방법에 관한 것이다.

- <7> 색소체는 광합성을 담당하는 엽록체(chloroplast), 전분저장을 하는 전분체(amyloplast), 색소를 포함하지 않는 백색체(leukoplast), 꽃 및 과일의 색에 관여하는 유색체(chromoplast) 등으로 분류되는데, 식물세포 하나에는 200개까지의 색소체가 존재하고 한 개의 색소체는 100여개의 게놈을 가지고 있어서 10,000~50,000 copy의 유전자가 존재한다. 반면에 식물의 핵은 보통 1~2 copy의 게놈을 가지고 있다.
- <8> 따라서 논리적으로는 색소체 형질전환에 의한 외래유전자의 도입은 핵을 형질전환시켰을 때와 비교하여 목적 단백질을 약 10,000배 이상 효율적으로 생산할 수 있는 것이다.
- <9> 최근 이와 같은 논리하에 색소체 형질전환 방법에 의하여 외래유전자를 식물에 도입함으로써 새로운 형질을 식물에 부여하는 방법이 개발된 바 있다(Svab et al., 1990; Staub et al., 2000). 이러한 색소체 형질전환 방법은 크게 ① 색소체 형질전환단계와 ② 형질전환된 식물체의 선발단계로 이루어진다.
- <10> 예를들면, 색소체 형질전환은, homologous recombination에 의해 가능한데 기존의 색소체 염기서열을 homologous recombination을 위한 border로 사용하고 여기에 외래유전자를 연결한 후 particle bombardment 방법으로 도입하는 것이다.
- <11> 이어서 색소체에 형질전환 이후 세포 내의 모든 색소체가 homoplasmy하게 되도록

록하기 위해서 2~7회의 선발과정을 거친 후 재분화 식물체를 유도한다. 이러한 선발과정이
결여되면 세포 내 일부의 색소체만 형질전환 되기 때문에 식물체가 성체로 발달하는 과정에서
형질전환된 색소체가 점차 사라지게 된다.

<12> 색소체 형질전환에 관한 대부분의 연구가 담배에서 이루어져 있고 그 외에 애기장대, 감자, 토
마토 등에서 성공한 사례가 있다. 그러나 담배 이외의 식물체에서는 형질전환 효율이 매우 낮
은 것으로 알려져 있다. 이러한 낮은 효율은 색소체의 형질전환이 매우 미흡하게 일어나고,
결과적으로 형질전환된 식물체를 선별하는 과정에 오랜 시간과 복잡한 작업이 요구되기 때문인
것으로 판단된다. 다만, 담배의 경우 수많은 연구를 통하여 그 특성이 널리 알려져 있기 때문
에 비교적 높은 효율의 달성이 가능한 것이다.

<13> 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 색소체 내에서 homologous recombination 효율을 높이는
것이 중요한 해결 방법이 될 수 있다.

<14> Homologous recombination에는 리컴비네이즈 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다. 대장균
의 리컴비네이즈를 미생물, 고등식물인 담배 또는 동물의 핵에서 발현되도록 함으로써 핵 내에
homologous recombination 효율이 10배이상 증가했음이 보고되었다(Stohl and Seifert, 2001;
Bakhlanova et al., 2001; Reiss et al., 1996; 1997; Shcherbakova et al., 2000; Vispe et
al., 1998).

<15> 따라서 식물체의 색소체 형질전환 효율증가와 형질전환된 식물체 선발과정의 단기화를 위한 새
로운 방법의 모색이 요구되고 있는 것이 현실이다.

<16> 이에 본 발명자들은 색소체 형질전환에서 homoplasmy를 만드는 장기간의 선발과정과 낮은 형
질전환효율의 문제점을 극복하고 간편하고 효율적인 형질전환 방법을 개발하기 위하여 노력한

결과, 핵에 도입된 리컴비네이즈가 색소체로 이동하도록 한 식물체를 이용하고 목적 유전자 서열과 마커 유전자 서열을 포함하는 색소체 형질전환용 벡터를 작제하여 색소체 형질전환을 수행한 다음 색소체에서의 마커 유전자의 발현정도에 따라 선별함으로써 homologous recombination 효율과 형질전환 효율이 높은 색소체 형질전환방법을 완성하게 된 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <17> 본 발명은 색소체에서 리컴비네이즈를 발현하는 식물체를 이용하여 간단한 조작과 높은 성공률로 homologous recombination과 색소체 형질전환이 가능하게 하는 새로운 식물체 형질전환 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성】

- <18> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, (A) 색소체에서 활성을 나타내는 원핵세포 리컴비네이즈의 유전자 서열 및 고등식물의 색소체에 대한 표적서열(targeting sequencing)을 포함하는 식물 핵 형질전환용 벡터를 제작하는 리컴비네이즈발현벡터 제작단계와 (B) 상기 리컴비네이즈발현벡터를 이용하여 핵 형질전환된 식물체를 제작하는 1차형질전환식물 획득단계와, (C) 색소체에서 발현될 수 있는 최소한 1개 이상의 목적 유전자 서열 및 선발 마커 유전자 서열을 포함하는 식물 색소체 형질전환용 벡터를 제작하는 색소체용벡터 제작단계 및 (D) 상기 색소체용 벡터를 이용하여 상기 1차형질전환식물의 색소체를 형질전환하는 2차형질전환식물 획득단계를 포함하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법에 관한 것이다.

- <19> 또한 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 미리 색소체에서 활성을 나타내는 리컴비네이즈의 유전자에 의해 형질전환되어 있는 식물체를 이용하여 유사한 방법으로 색소체의 형질전환효율을 높이는 방법을 제공한다.
- <20> 즉, 본 발명은 (A) 색소체에서 발현될 수 있는 최소한 1개 이상의 목적 유전자 서열 및 선발 마커의 유전자 서열을 포함하는 식물 색소체 형질전환용 벡터를 제작하는 색소체 형질전환용 벡터 제작단계와 (B) 색소체에서 활성을 나타내는 리컴비네이즈의 유전자에 의해 형질전환된 식물체의 색소체를 상기 색소체 형질전환용 벡터를 이용하여 색소체를 형질전환하는 2차형질전환식물 획득단계를 포함하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법에 관한 것이다.
- <21> 즉, 본 발명은 원핵세포 유래의 리컴비네이즈가 색소체로 이동하여 색소체 내에서 리컴비네이즈가 활성을 가지는 식물체(1차형질전환식물)에 외래의 목적 유전자 및 마커 유전자를 가지는 색소체 형질전환용 벡터를 형질전환하여 색소체 형질전환효율을 높이는 방법을 제공하는 것이다.
- <22> 본 발명에서 리컴비네이즈로는 고등식물의 색소체 내에서 활성을 나타내는 것이라면 어떤 것이라도 사용가능한데, 구체적으로는 *Deinococcus radiodurans* recA, 대장균의 recA 및 이들의 homologue 등을 사용할 수 있다.
- <23> 본 발명에서 리컴비네이즈 단백질이 색소체로 이동하도록 하는 표적서열은 색소체로 이동하는 어떤 단백질의 표적서열이라도 사용이 가능하다. 예를들면, 루비스코 스몰 서브유닛(Rubisco small subunit), 에지페이지(AGPase), 클로로필 에이비(Cab) 단백질 등의 표적서열을 이용할 수 있다.

- <24> 본 발명의 색소체 형질전환용 벡터에 포함되는 외래 유전자로는 그 종류에 제한이 없이 식물세포에 도입하고자 하는 외래 형질을 발현하는 유전자는 모두 가능하다. 예를들면, 비티톡신(Bt) 유전자, 제초제(bar, glyphosate) 저항성 유전자, 소마토트로핀(somatotropin) 등과 같은 인체유래 단백질의 유전자 등을 단독으로 또는 필요에 따라 복수개가 적용될 수 있다.
- <25> 본 발명의 색소체 형질전환용 벡터에 포함되는 선발 마커 유전자로는 2차형질전환된 식물개체를 2차형질전환되지 아니한 개체와 차별화시킬 수 있는 생리화학적 특성을 나타내는 단백질 유전자를 사용할 수 있다. 예를들면, ① 스펙티노마이신(spectinomycin)이나 스트렙토마이신(streptomycin)에 저항성이 있는 16S 리보솜 서브유닛 유전자 또는 ② 스펙티노마이신이, 스트렙토마이신 또는 카나마이신(kanamycin) 등과 같은 항생제 저항성 단백질 유전자 또는 ③ 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase), 베테인 알데하이드 효소(BADH) 등과 같은 효소 유전자 또는 ④ GFP(green fluorescence protein) 유전자를 단독 사용하거나 복합적으로 사용할 수 있다. 특히 2차형질전환여부를 물리적으로 확인할 수 있도록 ④와 다른 것들을 함께 사용하는 것이 바람직하다. 이때 다른 선발 마커 유전자와 GFP 유전자를 오페론으로 연결하여 색소체 형질전환식물체(즉, 2차형질전환식물체)만이 선별배지에서 자랄 수 있게 하면서 동시에 시각적으로도 homologous recombination정도를 구분하면서 선발이 가능하도록 하는 것이 좋다.
- <26> 참고로, 식물체 색소체에 GFP가 존재하면 long wave UV 하에서 색소체가 녹색의 형광을 띠게 된다.
- <27> 이하 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

- <28> 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 이에 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 하기 실시예에서는 선발 마커 유전자로 스펙티노마이신 저항성 유전자와 GFP 유전자를 동시에 이용하였으나 다른 선발 마커 유전자만을 이용하거나, 다른 선발 마커 유전자와 GFP 유전자를 동시에 이용할 수 있음은 당연할 것이다. 또한 형질전환 대상식물을 담배로 설정하였으나 이 또한 다른 식물체로 확장할 수 있음은 당연할 것이다. 또한 실시예에서는 색소체에 미생물 리컴비네이즈를 가지는 식물체(1차형질전환식물체)를 직접 제작하였으나, 여타의 목적으로 이미 제작된 이러한 식물체를 활용할 수 있음도 당연할 것이다.
- <29> 기타 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 하기 실시예의 구체적인 방식 또는 이용물질들이 합리적인 범위에서 다른 방식 또는 이용물질들로 대체될 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식인에게 있어서 당연할 것이다.
- <30> 하기 실시예에서 표시되는 벡터들의 제작은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식인에게 있어서 용이한 일이기 때문에 이의 기탁을 생략하였다.
- <31> 실시예 1 : 리컴비네이즈를 가지는 식물 핵형질전환용 벡터 제작
- <32> 색소체에서 리컴비네이즈 발현하는 식물체를 생산하기 위하여, 우선 색소체로 이동되는 미생물 유래의 리컴비네이즈를 가지는 식물 핵형질전환용 벡터를 제작하였다.
- <33> PCR방법으로 애기장대(*Arabidopsis*) 리컴비네이즈의 표적서열과 *Deinococcus radiodurans*의 리컴비네이즈(recA) 유전자를 각각 클로닝하여 연결하고 35S 프로모터와 nos 터미네이터사이에 BamHI/SacI제한효소 부위에 도입하여 식물 핵형질전환용 벡터 pDrecAAT를 제작하였다.

<34> 보다 상세히 설명하면, *Deinococcus radiodurans* 균주(ATCC13939)로부터 DNA를 분리하여 PCR방법(서열1과 2를 첨가하여 PWO polymerase(BM co.)를 사용하여 denature : 94℃ 1분, annealing : 55℃ 1분, polymerazation : 72℃ 60초, 30 cycle 반응)으로 1.1 kb의 recA(리컴비네이즈) 유전자를 클로닝하고 35S 프로모터와 nos 터미네이터 사이에 BamHI/SacI 제한효소 부위에 도입하였다. 이와는 별도로 *Arabidopsis* genomic DNA로부터 PCR방법(서열3과 4를 첨가하여 PWO polymerase(BM co.)를 사용하여 denature : 94℃ 1분, annealing : 55℃ 1분, polymerazation : 72℃ 10초, 30 cycle 반응)으로 0.2kb의 색소체 표적서열을 클로닝하였다. 클로닝된 표적서열을 전술한 35S 프로모터와 리컴비네이즈 사이의 BamHI 제한효소부위에 도입하여 *Deinococcus radiodurans*의 리컴비네이즈 단백질이 색소체로 이동되도록한 식물 핵형질전환용 벡터를 제작하였다(도 1).

<35> 실시예 2 : 색소체에 미생물 리컴비네이즈를 가지는 식물체 획득

<36> 실시예 1에 의해 제작된 식물 핵형질전환용 벡터로 식물체를 1차형질전환시켰다. 형질전환 방법은 현재까지 알려져 있거나, 앞으로 개발될 식물 형질전환 방법이 적용될 수 있을 것이다. 구체적으로 본 실시예에서는 아그로박테리아(*Agrobacterium*) 공동배양법을 사용하였다.

<37> 실시예 1에 의해 제작된 식물 핵형질전환용 벡터를 freeze thaw 방법으로 아그로박테리아 (GV3101 strain)에 도입하여 50 mg/L 카나마이신, 50 mg/L 리팜피신이 첨가된 YEP 배지에서 2일간 배양한 후 담배의 형질전환에 사용하였다. 기내에서 배양한 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)의 잎 절편체를 띄운 MS(Murashige and skoog, 1962) 기본 액체배지 10 mL에, 2일간 키운 아그로박테리아 200 μ L를 넣고 2일간 공동 배양하였다. 멸균 증류수로 아그로박테리아를 세척한 후 100 mg/L 카나마이신, 300 mg/L 크라포란, 2 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA이 첨가된 MS

배지에서 25℃, 2,000 lux의 광 조건으로 배양하여 재분화개체를 선발하였다. 배양 3~4주 후 선발배지에서 발생한 shoot을 300 mg/L 크라포란, 100 mg/L 카나마이신이 첨가된 MS 기본배지로 옮겨 뿌리를 유도하고 토양으로 옮겨 온실에서 생육시켜 후대를 육성하였다.

<38> 식물 핵형질전환체에서 *Deinococcus radiodurans*의 리컴비네이즈의 도입 및 발현은 형질전환체의 잎에서 총 RNA를 분리하여 노던블랏(northern blot)을 통하여 확인하였다(도 2). 도 2에서 Con는 형질전환되지 않은 식물체를, 1, 2는 형질전환되어 리컴비네이즈를 발현하는 식물체를 나타내며, A: 노던 블랏을, B는 loading한 total RNA를 나타낸다.

<39> 1차 형질전환된 식물체를 그대로 이용할 수도 있고 종자를 얻어 후대를 이용할 수도 있다.

<40> 실시예 3 : GFP를 가지는 색소체 형질전환용 벡터 제작

<41> 형질전환식물체를 UV하에서 시각적으로 형질전환 여부를 구별할 수 있는 색소체 형질전환용 벡터를 작제하기 위하여 PCR 방법으로 앞부분에 리보솜 결합 영역(ribosome binding site)를 가지도록 GFP 유전자(선별 마커 유전자)를 클로닝하여 기존의 색소체 형질전환용 벡터인 CtV2의 aadA 유전자 뒤의 XbaI 제한효소 부위에 도입하여 색소체 형질전환용 벡터 CtVG를 제작하였다.

<42> 보다 구체적으로는, GFP의 변형인 mGFP4 유전자가 색소체내에서 발현되도록하기 위하여 개시코돈(start codon) 앞쪽에 리보솜 결합영역(AGGAGGTATAACA)를 가지도록 primer를 제작하여 PCR 방법(서열5과 6를 첨가하여 PWO polymerase(BM co.)를 사용하여 denature : 94℃ 1분, annealing : 55℃ 1분, polymerazation : 72℃ 40초, 30 cycle 반응)으로 GFP 유전자를 클로닝하여 기존의 색소체 형질전환용 벡터인 CtV2내의 스펙티노마이신 저항성 유전자인 aadA 유전자

뒤의 XbaI 제한효소 부위에 도입하여 GFP유전자가 오페론으로 발현되도록 한 색소체 형질전환용 벡터 CtVG를 제작하였다(도 3).

<43> 실시예 4 : particle bombardment에 의한 색소체 형질전환

<44> 실시예 2에서 제작한 핵형질전환 식물체의 후대 및 핵형질전환되지 않은 대조구 식물체에 대하여 실시예 3에서 제작한 벡터로 형질전환 실험을 수행하였다.

<45> 핵형질전환 식물체 및 대조구 식물체를 각각 기내에서 8주간 발아시킨 후 유식물체의 잎을 분리하여 1 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA이 첨가된 MS배지에서 치상하여 색소체 형질전환에 사용하였다.

<46> 0.6 μ m 지름의 금입자(gold particle)에 CtVG 색소체 형질전환용 벡터를 coating한 후 BioRad사의 PDH-1000/He gene delivery system기기를 이용하고 1,100 psi의 Acceleration Power, 9 cm의 Target distance, 28 in/Hg의 Vacuum조건으로 색소체 형질전환을 수행하였다. 이후 25°C, 2,000 lux의 암 조건으로 2일간 배양하고 담배 잎을 2-5 mm크기의 절편으로 나누어 1 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, 500mg/L 스펙티노마이신이 첨가된 MS배지에서 배양하여 색소체 형질전환식물체를 선발하였다.

<47> 실시예 5 : 담배의 색소체 형질전환 효율 조사

<48> 이상의 과정으로 제작된, 색소체에서 리컴비네이즈를 발현하는 식물체에 색소체 형질전환용 벡터 CtVG가 도입된 2차 형질전환식물체의 색소체 형질전환 효율을 조사하였다.

<49> 색소체 형질전환이 이루어지지 않은 식물체는 UV 조사시에 엽록소의 자체 형광인 붉은 색을 보이는 반면, 색소체가 형질전환 된 경우 GFP가 발현되므로 GFP의 발현 정도에 따라 주황색에서 녹색의 형광을 나타낸다. 이러한 색소체 형질전환 여부를 대조구(미생물 리컴비네이즈가 형질전환 되지 않은 경우)와 비교하여 형질전환 효율을 조사하여 미생물 리컴비네이즈를 이용한 경우 색소체 형질전환효율이 높아졌음을 확인하였다.

<50> 구체적으로는, 전기 실시예 4에서 형질전환 후 1회 선발(즉 4주 배양)된 총 페트리디쉬 중 long wave UV 하에서 녹색의 형광을 띠는 재분화 shoot을 가진 페트리 디쉬를 조사하여 형질전환 효율을 조사하였다. 그 결과 미생물 리컴비네이즈를 가지는 식물체가 대조구에 비하여 2배 이상의 형질전환 효율을 보이는 것을 확인하였다(표 1).

<51> 【표 1】

색소체 형질전환 효율

	대조구	본 발명에 의한 식물체
전환비 (전환효율%)	5/11 (45.4%)	8/9 (88.9%)

$$\text{전환비} = \left[\frac{\text{녹색형광을 띠는 petridish 수}}{\text{bombardment 수}} \right]$$

<52> 또한 4주간 선발된 형질전환 shoot으로부터 원형질체를 분리하여 세포내에서 GFP를 발현하는 색소체를 형광현미경하에서 조사하여 homologous recombination 효율을 조사하였다. 이 경우에도 본 발명에 의한 식물체(미생물 리컴비네이즈를 가지는 식물체를 2차형질전환한 경우)는 대조구(미생물 리컴비네이즈를 가지지 않는 식물체를 2차형질전환한 경우)에 비하여 훨씬 많은

GFP 발현양을 나타냈다(도 4). 도 4에서 A는 엽록체가 전혀 형질전환 되지 않은 담배식물체의 세포를, B는 대조구를, C는 본 발명에 의한 방법에 의해 획득된 담배식물체의 세포를 나타낸다.

- <53> 본 발명에 의한 식물체의 1회 선발시 GFP의 발현양은 2~3회 이상 선발과정을 거친 대조구의 GFP의 발현양이 비슷하다. 즉, 미생물 리컴비네이즈를 가지는 식물체를 2차로 형질전환시키는 본 발명에 의한 색소체 형질전환 방법은 종래의 형질전환 방법(대조구)에 비하여 homologous recombination효율이 현저히 증가된 것을 확인할 수 있다.

【발명의 효과】

- <54> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 식물의 색소체가 미생물의 리컴비네이즈를 가지도록 핵 형질전환된 식물체를 사용하여 색소체 형질전환 효율 및 homologous recombination 효율을 높이는 방법에 의하면, 기존의 homoplasmy를 만들기 위하여 필요한 장기간의 선발과정을 단축시킬 수 있고, 담배 이외의 식물에서 색소체 형질전환 효율이 낮거나 색소체 형질전환이 되지 않았던 식물에 색소체 형질전환기술을 적용할 수 있다. 이러한 방법으로 형질전환 된 식물세포는 다양한 작물을 이용하여 유용한 외래 단백질을 발현하여 수득하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.
- <55> 본 발명에 의하면, 종래에 비해 homologous recombination효율이 훨씬 증가하여 선발과정의 횟수를 1/2~1/3 이하로 감소시킬 수 있고, 2배 이상의 형질전환 성공률로 색소체 형질전환식물체를 제작할 수 있다.

<56> <참고문헌>

- <57> Svab, Z., Hajdukiewicz, P. & Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87, 8526-8530.
- <58> Staub, J. M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T. J., Hunter, P., Nehra, N. et al. (2000). High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnol.* 18, 333-338.
- <59> Stohl EA, Seifert HS.(2001) The recX gene potentiates homologous recombination in *Neisseria gonorrhoeae*.
Mol Microbiol. 40:1301-10
- <61> Bakhlanova IV, Ogawa T, Lanzov VA. (2001) Recombinogenic Activity of Chimeric recA Genes (*Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli*). A search for reca protein regions responsible for this activity. *Genetics.* 159:7-15
- <62> Reiss, B., Klemm, M., Kosak, H. & Schell, J. (1996) RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3094-3098.

- <63> Reiss, B., Kosak, H., Klemm, M. & Schell, J. (1997) Targeting of a functional Escherichia coli RecA protein to the nucleus of plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 253, 695-702.
- <64> Shcherbakova OG, Lanzov VA, Ogawa H, Filatov MV. (2000) Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells. *Mutat Res.* 459:65-71.
- <65> Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 26:2859-64.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

식물체의 색소체를 형질전환하는 방법에 있어서,

- (A) 색소체에서 활성을 나타내는 리컴비네이즈의 유전자 서열 및 색소체에 대한 표적서열 (targeting sequencing)을 포함하는 식물 핵 형질전환용 벡터를 제작하는 리컴비네이즈발현벡터 제작단계;
- (B) 상기 리컴비네이즈발현벡터를 이용하여 핵 형질전환된 식물체를 제작하는 1차형질전환식물 획득단계;
- (C) 색소체에서 발현될 수 있는 최소한 1개 이상의 목적 유전자 서열 및 선발 마커 유전자 서열을 포함하는 식물 색소체 형질전환용 벡터를 제작하는 색소체용벡터 제작단계;
- (D) 상기 색소체용벡터를 이용하여 상기 1차형질전환식물의 색소체를 형질전환하는 2차형질전환식물 획득단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 리컴비네이즈 유전자는 원핵생물 유래의 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

상기 선발 마커는

스펙티노마이신(spectinomycin)이나 스트렙토마이신(streptomycin)에 저항성이 있는 16S 리보솜 서브유닛 또는

스펙티노마이신이 , 스트렙토마이신 또는 카나마이신(kanamycin) 등과 같은 항생체에 저항성을 나타내는 단백질 또는

시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase), 베타인 알데하이드 효소(BADH) 등과 같은 효소 및/또는

GFP(green fluorescence protein)인 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법

【청구항 4】

식물체의 색소체를 형질전환하는 방법에 있어서,

- (A) 색소체에서 발현될 수 있는 최소한 1개 이상의 목적 유전자 서열 및 선발 마커의 유전자 서열을 포함하는 식물 색소체 형질전환용 벡터를 제작하는 색소체 형질전환용 벡터 제작단계;
- (B) 색소체에서 활성을 나타내는 리컴비네이즈의 유전자에 의해 형질전환된 식물체의 색소체를 상기 색소체 형질전환용 벡터를 이용하여 색소체를 형질전환하는 2차형질전환식물 획득단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

상기 선발 마커는

스펙티노마이신(spectinomycin)이나 스트렙토마이신(streptomycin)에 저항성이 있는 16S 리보솜 서브유닛 또는

스펙티노마이신이 , 스트렙토마이신 또는 카나마이신(kanamycin) 등과 같은 항생제에 저항성을 나타내는 단백질 또는

시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase), 베타인 알데하이드 효소(BADH) 등과 같은 효소 및/또는

GFP(green fluorescence protein)인 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법

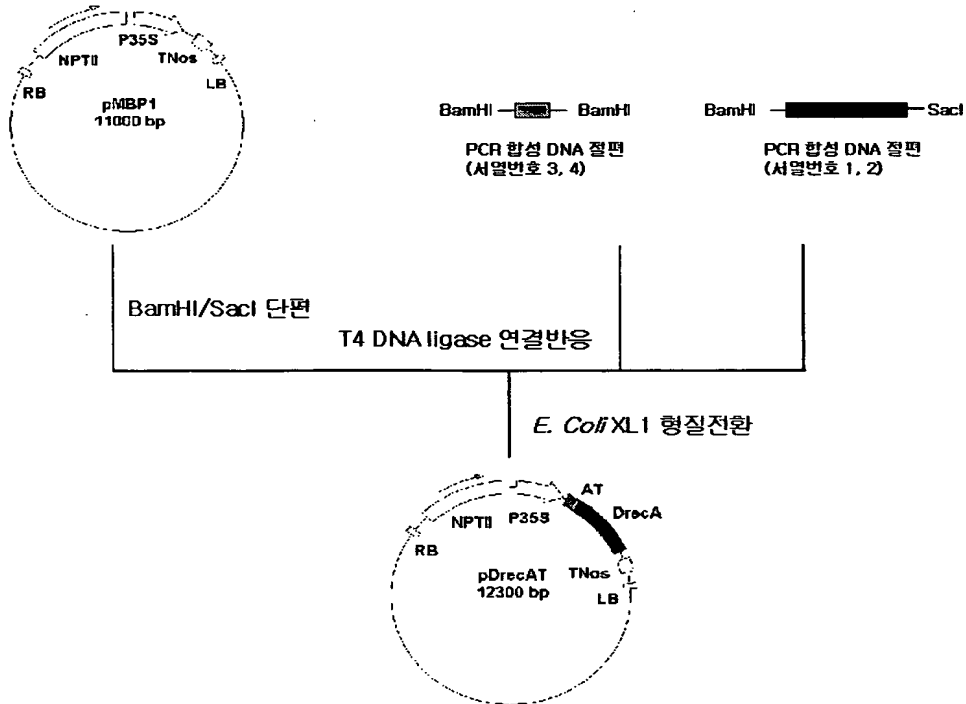
【청구항 6】

제 5 항에 있어서,

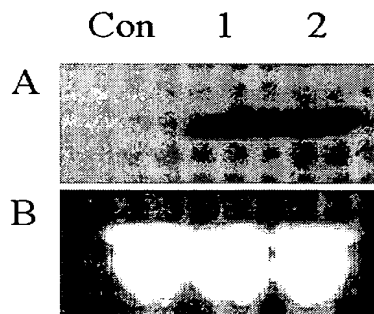
상기 리컴비네이즈 유전자는 원핵생물 유래의 것을 특징으로 하는 식물체의 색소체를 형질전환하는 방법.

【도면】

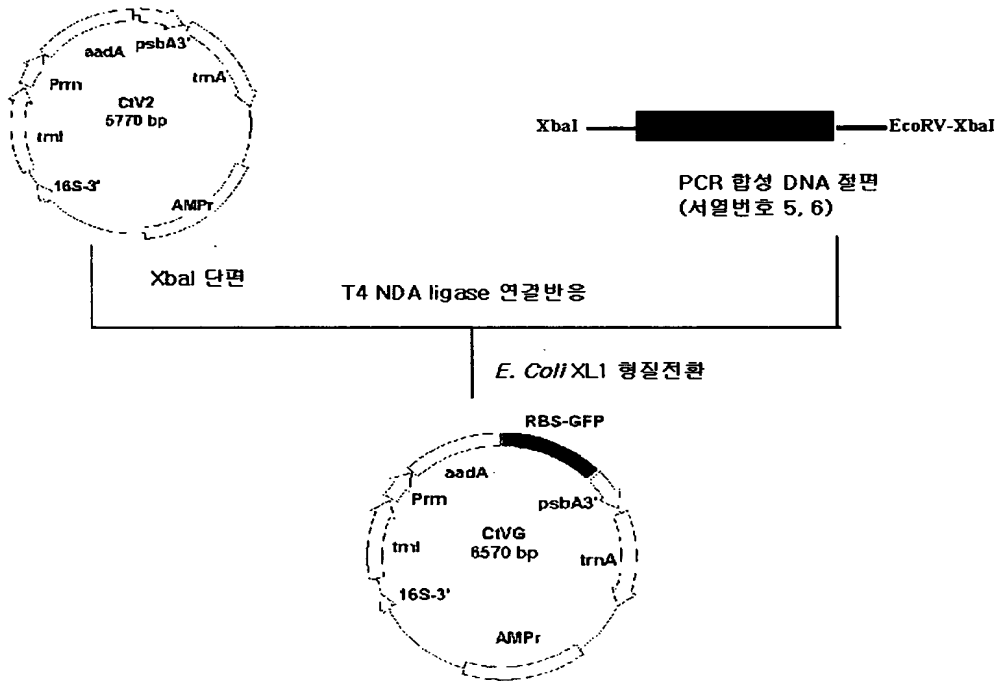
【도 1】



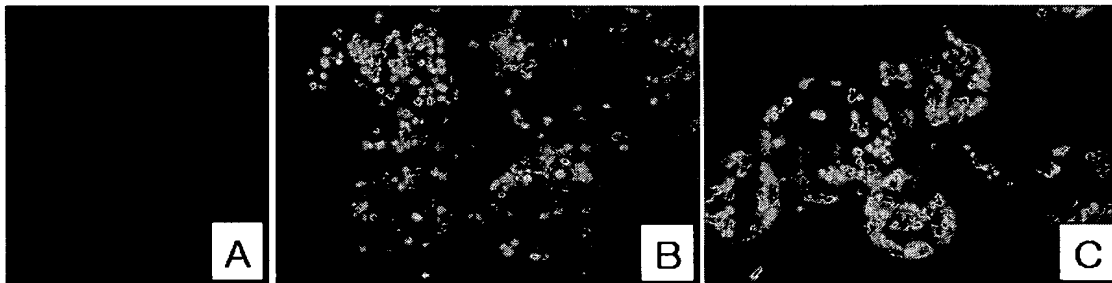
【도 2】



【도 3】



【도 4】



【서열목록】

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120> Method for Recombinating Plasti
Using Procaryotic Recombinase Gene <130> P0102-001 <160> 6 <170> KopatentIn 1.71 <210>
1 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 1 aatggatcca

tgagcaagga cgccgc

26 <210> 2 <211> 26 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 2 aaatctagag gggcacgcag caagag

26 <210> 3 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 3

acaggatcca tggattcaca gctagt

26 <210> 4 <211> 26 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 4 acaggatccg gcgtagacgg taaccg

26 <210> 5 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 5

ttctctagaa ggaggtataa caatgagtaa aggag

35 <210> 6 <211> 33 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 6 gccctctaga tatcttattt gtatagttca tcc

33

